

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591811

研究課題名（和文）肺虚血再灌流障害の発症機序—TLR4を介した細胞内シグナル伝達経路の解明—

研究課題名（英文）Toll-like receptor 4 mediates lung ischemia-reperfusion injury.

研究代表者

島本 亮（SHIMAMOTO AKIRA）

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90324524

研究成果の概要（和文）：

Toll-like receptor 4 (TLR4)を介した細胞内シグナル伝達において MyD88 依存経路が肺虚血再灌流障害を、MyD88 非依存経路が ischemic preconditioning を誘導することが示された。したがって、TLR4 から NF-κB に至るシグナル伝達経路の相違が NF-κB の相反する作用の振り分けに関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Ischemic preconditioning is mediated a MyD88-independent pathway, leading to NF-κB activation and protection against lung ischemia reperfusion injury. We conclude that an activation of MyD88 or TRIF, which are associate proteins of Toll-like receptor 4, would regulate a role of NF-κB to injure or preserve lung function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：呼吸器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：外科、移植・再生医療、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでマウス心筋虚血再灌流モデルにて虚血再灌流障害の発症機序における TLR4 の関与を明らかにしてきた。TLR4 mutant マウス(C3H/HeJ)及び TLR4 antagonist (eritoran)を用いた検討ではリン酸化 JNK、NF-κB、AP-1 活性の抑制の結果、有意な梗塞範囲の縮小を認めた(J Thorac Cardiovasc Surg 128(2):170-9,2004、Circulation 114(1 Suppl):I210-4,2006)。一方、TLR4/TLR2/MyD88 knock-out (KO)マウスを用いた検討において

「30 分間虚血+120 分間再灌流」ではいずれの KO マウスでも wild type(WT)マウス (C57BL/6)と比較して有意な梗塞範囲の縮小を認める一方で、「60 分間虚血+120 分間再灌流」では MyD88 KO マウスのみ WT マウスと比較して有意な梗塞範囲の縮小を認めたが、この結果について具体的考察を行うことが出来なかった。しかし、最新の知見にて TLR4/TLR2 からのシグナル伝達経路として既知の MyD88 を経由し NF-κB に到る経路 (MyD88 dependent signaling pathway)に加え、

MyD88 を経由せずに NF- κ B に到る経路 (MyD88 independent signaling pathway) が示唆されている (Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*;16:3-9,2004)。多分にこのシグナル伝達経路の相違が NF- κ B の cytoprotective/cytodestructive 作用の振り分けに関与しているのではないかと仮定される。本応募研究課題では、これら心筋虚血再灌流障害の研究の成果を応用し、肺虚血再灌流障害の発症機序における TLR4 を介した細胞内シグナル伝達経路を解明する。

TLR を介したシグナルが虚血再灌流障害で、どのように惹起されるかは未だ明らかにされておらず、虚血再灌流というストレスによって産生・誘導される MAPK、転写因子、炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着分子等の経路を明らかにすることで虚血再灌流障害を抑制し、心肺移植時の臓器保存法の break through として臨床に応用される可能性が考えられる。

2. 研究の目的

肺移植におけるドナー肺長期保存を可能にすべく、肺虚血再灌流障害の発症機序における TLR4 の役割を明らかにする。特に、TLR4 から NF- κ B に至るシグナル伝達経路の相違 (MyD88 dependent signaling pathway/ MyD88 independent signaling pathway) が NF- κ B の cytoprotective/cytodestructive 作用の振り分けに関与しているのではないかと仮定し、TLR4 を介した細胞内シグナル伝達経路についても明らかにする。

- ① 虚血再灌流障害の発症機序における TLR4 の役割を明らかにする (具体的に虚血再灌流という酸化ストレスが肺組織を構成するどの細胞においてどの様に TLR4 から細胞内シグナル伝達機構に作用するかを明らかにする)。
- ② 虚血再灌流障害の発症機序における TLR4 以下の細胞内シグナル伝達機構、転写因子、及び mRNA 発現を系統的に明らかにする (具体的にどの伝達経路が関与しているかを明らかにする)。

3. 研究の方法

WT マウス、TLR4/MyD88/TRIF KO マウスを用いて「60 分間虚血+180 分間再灌流」の肺虚血再灌流モデル、「5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+30 分間再灌流+60 分間虚血+180 分間再灌流」の ischemic preconditioning+肺虚血再灌流モデルを作製し、①肺障害の測定 (PI、BALF 中の細胞数及び MPO 活性)、②MAPKs (p38、JNK、ERK) 活性の測定 (Western-blot 法)、③転写因子 (NF- κ B、AP-1) 活性の測定 (EMSA 法)、④炎症性メディエーター (cytokine、chemokine、接着分子等) 発現の測定 (BALF にて ELISA 法)、

⑤アポトーシス及び関連タンパク質/遺伝子 (caspase3、Akt/PI3K 等) 発現の測定 (TUNEL 染色法、Western-blot 法、酵素活性法、及び RT-PCR 法) を行い、MyD88 dependent/MyD88 independent (Figure 1, and 2) 経路の関与、ひいては NF- κ B の cytoprotective/cytodestructive 作用の振り分けへの関与について検討を行う。

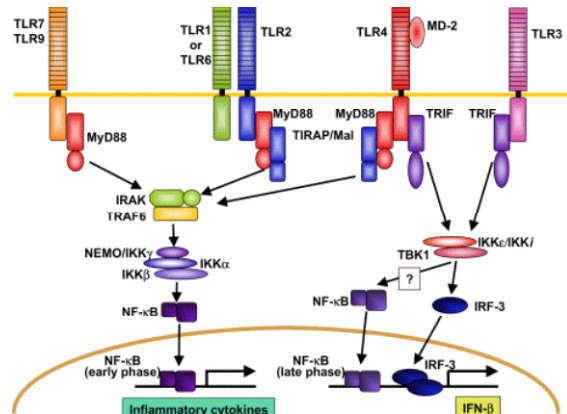


Fig 1. TLR-mediated MyD88-dependent signaling

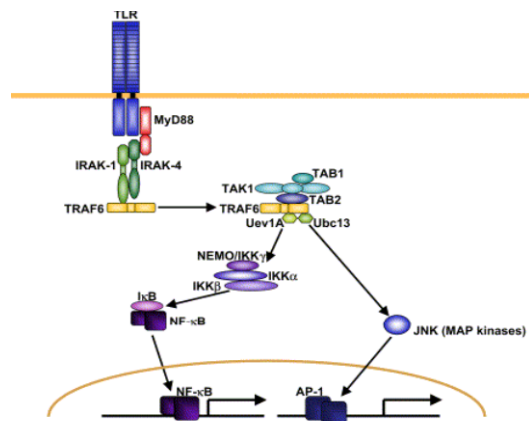


Fig 2. TLR-mediated MyD88-independent signaling

4. 研究成果

TLR4 KO マウス及び MyD88 KO マウスでは WT マウスと比べ、肺虚血再灌流障害は有意に抑制され (PI: $P < .001$, Figure 3、MPO 活性: $P < .002$, Figure 4)、同時に NF- κ B 活性も有意に抑制された ($P < .001$, Figure 5)。一方、ischemic preconditioning+肺虚血再灌流において WT マウス及び MyD88 KO マウスでは肺虚血再灌流障害は有意に抑制されるも、TLR4 KO マウス及び TRIF KO マウスでは肺虚血再灌流障害の抑制を認めなかった (Figure 3, 4, and 5)。

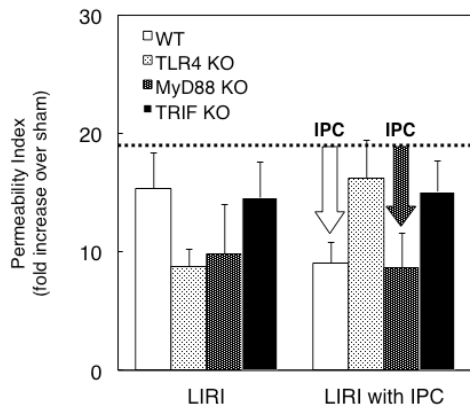


Fig. 3 Lung Vascular Permeability after LIRI with IPC

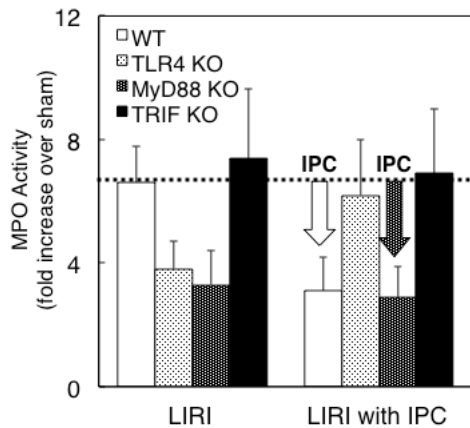


Fig. 4 MPO Activation after LIRI with IPC

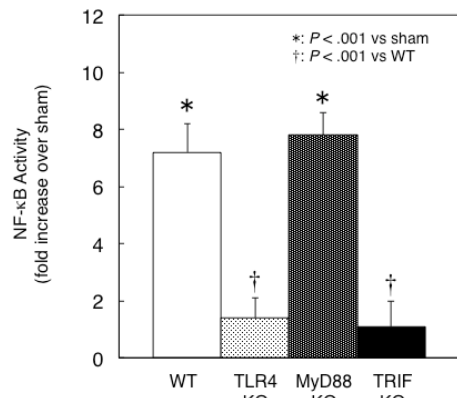


Fig. 5 NF-κB Activation after LIRI with IPC

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Invited commentary. Shimamoto A. Ann Thorac Surg. 2012 Jan;93(1):288-9.(査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. MyD88 非依存経路を介した肺 ischemic preconditioning 現象の発症機序に関する研究
島本 亮、庄村 心、高尾仁二、新保秀人
第 27 回日本呼吸器外科学会総会(平成 22 年 5 月 13 日、仙台市)

2. MyD88-independent signaling pathway is involved with lung ischemic preconditioning.
Shimamoto A, Yajima Y, Shomura S, Takao M, Shimpo H.
30th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society of Heart and Lung Transplantation (平成 22 年 4 月 21 日、シカゴ・アメリカ合衆国)

3. MyD88 非依存経路を介した肺 ischemic preconditioning 現象の発症機序に関する研究
島本 亮、谷島義章、庄村 心、高尾仁二、新保秀人
第 26 回日本肺および心肺移植研究会 (平成 22 年 1 月 30 日、大阪市)

4. MyD88 dependent signaling pathway is involved with lung ischemia-reperfusion injury.
Shimamoto A, Yajima Y, Shomura S, Takao M, Shimpo H.
29th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society of Heart and Lung Transplantation (平成 21 年 4 月 22 日、パリ・フランス)

6. 研究組織

(1)研究代表者

島本 亮 (SHIMAMOTO AKIRA)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90324524

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

高尾 仁二 (TAKAO MOTOSHI)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30263007

庄村 心 (SHOMURA SHIN)
三重大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70452224